

· 实验研究 ·

ERK 信号通路在右美托咪定减轻小鼠神经母细胞瘤细胞氧化应激损伤中的作用

赵文静 饶竹青 刘存明

【摘要】 目的 观察右美托咪定对过氧化氢(H_2O_2)所致小鼠神经母细胞瘤细胞(mouse neuroblastoma N2a cells, N2a)氧化应激损伤的影响,探讨 ERK 信号通路的作用。**方法** 在 N2a 细胞培养基中加入一定浓度的 H_2O_2 建立 N2a 细胞氧化应激损伤模型。将细胞分为五组:对照组(C组)、右美托咪定组(D组)、 H_2O_2 组(H组)、 H_2O_2 + 右美托咪定组(HD组)、 H_2O_2 + 右美托咪定 + ERK 抑制剂组(HDP组)。H组、HD组和HDP组给予 $200 \mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 , HD组在 H_2O_2 处理前 30 min 加入 100 ng/ml 右美托咪定, HDP组在 H_2O_2 处理前 30 min 加入 100 ng/ml 右美托咪定和 $20 \mu\text{mol/L}$ ERK 抑制剂 PD98059, D组在相应时点加入 100 ng/ml 右美托咪定, C组给予等容量生理盐水。在 H_2O_2 刺激 1 h, 检测细胞上清 SOD 活性, 并分析 ERK 磷酸化水平; H_2O_2 刺激 4 h, 观察细胞生存、细胞形态学变化。**结果** 与 C 组比较, H 组 N2a 细胞生存率明显降低, 细胞形态明显损伤, SOD 活性明显下降($P < 0.05$); 与 H 组比较, HD 组的细胞生存率明显升高, 细胞形态明显改善, SOD 活性明显升高, ERK 磷酸化水平明显增强($P < 0.05$); 与 HD 组比较, HDP 组细胞生存率明显降低, 细胞形态明显恶化, SOD 活性明显降低($P < 0.05$)。C 组和 D 组细胞生存率、细胞形态、SOD 活性及 ERK 磷酸化水平差异无统计学意义。**结论** 右美托咪定预处理能够减轻 H_2O_2 所致的 N2a 细胞氧化应激损伤, 其机制可能是通过激活细胞内 ERK 信号通路和提高 SOD 活性。

【关键词】 右美托咪定; 神经母细胞瘤; 氧化应激损伤; ERK 信号通路

Role of ERK signaling pathway in dexmedetomidine against mouse neuroblastoma N2a cell injury induced by oxidative stress ZHAO Wenjing, RAO Zhuqing, LIU Cunming. Department of Anesthesiology, The First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

Corresponding author: LIU Cunming, Email: mingliu870@sohu.com

【Abstract】 Objective To investigate the role and underlying mechanism of dexmedetomidine in protecting mouse neuroblastoma N2a cells against oxidative stress injury, and to discuss the effect of ERK signaling pathway. **Methods** N2a cell oxidative stress injury model was established by H_2O_2 treatment. Cells were divided into 5 groups: control group (group C), H_2O_2 group (group H), dexmedetomidine group (group D), H_2O_2 + dexmedetomidine group (group HD), H_2O_2 + dexmedetomidine + ERK inhibitor group (group HDP). Group H, group HD and group HDP were given $200 \mu\text{mol/L}$ H_2O_2 with or without 100 ng/ml dexmedetomidine and $20 \mu\text{mol/L}$ ERK inhibitor PD98059, group D was treated with dexmedetomidine at the corresponding point, group C was treated with equal normal saline. After 1, 4 hours of H_2O_2 stimulation, cell survival, morphology changes, SOD production and ERK intracellular signaling pathway were compared between groups. **Results** Compared to group C, N2a cells in the group H demonstrated significantly reduced cell survival, much worse cell morphology and less SOD production ($P < 0.05$). Compared to group H, N2a cells in group HD demonstrated significantly increased cell survival, much better preserved cell morphology, higher levels of SOD and enhanced ERK activation ($P < 0.05$); Compared to group HD, cells in the group HDP had markedly decreased cell survival, worse cell morphology and lower SOD level ($P < 0.05$). No significant changes were found in cell survival, morphology changes, SOD production and ERK intracellular signaling pathway between the groups C and D. **Conclusion** Dexmedetomidine protected mouse neuroblastoma N2a cells against oxidative stress injury by regulating ERK activation and SOD production.

【Key words】 Dexmedetomidine; Neuroblastoma; Oxidative stress injury; ERK

DOI:10.12089/jca.2018.05.018

作者单位: 210029 南京医科大学第一附属医院麻醉科

通信作者: 刘存明, Email: mingliu870@sohu.com

signaling pathway

右美托咪定具有镇静、镇痛、抑制交感神经等作用,具有减少麻醉药用量,保持血流动力学稳定和呼吸抑制轻等特点。近年来,右美托咪定的神经保护功能在多种神经损伤模型中得到证实^[1-3]。其中右美托咪定对神经缺血-再灌注损伤的减轻作用越来越被重视。动物实验证实在脑半球缺血和全脑缺血-再灌注等损伤模型中,右美托咪定可以减轻神经细胞水肿、凋亡和坏死,减轻神经功能障碍。但目前对右美托咪定减轻神经缺血-再灌注损伤的机制尚不清楚。氧化应激在脑缺血-再灌注损伤、神经退行性变的发生和发展中具有重要作用。过氧化氢(H_2O_2)是活性氧的重要成分,可扩散到细胞内,通过过氧化线粒体和细胞膜上脂质破坏线粒体和细胞膜的完整性,是体外构建氧化应激模型的重要手段。目前右美托咪定能否保护神经细胞对抗 H_2O_2 引起的化学性氧化应激损伤报道较少。本研究探讨右美托咪定对 H_2O_2 所致 N2a 细胞损伤的影响以及 ERK 信号通路在其中的作用。

材料与方法

实验材料与仪器 实验细胞:小鼠神经母细胞瘤细胞株 N2a 细胞。药物与试剂:胎牛血清、DMEMH 培养基、Hoechst33342 荧光染料、右美托咪定、抗 ERK 和 p-ERK、GAPDH 等抗体、MTT、相差倒置显微镜和细胞培养箱。

实验细胞分组与处理 N2a 细胞培养于含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 U/ml 链霉素的 DMEMH 培养基中,置于 5% CO_2 , 37℃ 培养箱中培养,0.25% 胰酶(含 0.02% EDTA)消化传代,选择对数生长期细胞进行实验。细胞共分为五组:对照组(C组)、右美托咪定组(D组)、 H_2O_2 组(H组)、 H_2O_2 + 右美托咪定组(HD组)、 H_2O_2 + 右美托咪定 + ERK 抑制剂组(HDP组)。H组、HD组和 HDP组给予 200 μ mol/L 的 H_2O_2 ,HD组在 H_2O_2 处理前 30 min 加入 100 ng/ml 右美托咪定,HDP组在 H_2O_2 处理前 30 min 加入 100 ng/ml 右美托咪定和 20 μ mol/L ERK 抑制剂 PD98059,D组在相应时点加入 100 ng/ml 右美托咪定,C组给予等容量生理盐水。

超氧化物歧化酶(SOD)活性测定 H_2O_2 刺激时间 1 h 后,收集细胞上清,4℃ 下 800 r/min 离心 5

min 后取上清,用于测定 SOD 活性。

Western blot 法检测 培养在 6 cm 培养皿的细胞,在 H_2O_2 刺激时间 1 h 后,所有组细胞加入细胞裂解液,冰上裂解 30 min,在 4℃ 12 000 r/min 离心 20 min 后取上清,BCA 法测定蛋白浓度,以每孔 30 μ g 上样,利用电转系统转膜至 PVDF 膜,5% 牛奶封闭 2 h,分别孵育一抗过夜,TBST 洗三遍后,二抗孵育 2 h,TBST 洗三遍后,用全自动化学发光成像系统显像分析 ERK、p-ERK 等蛋白含量。

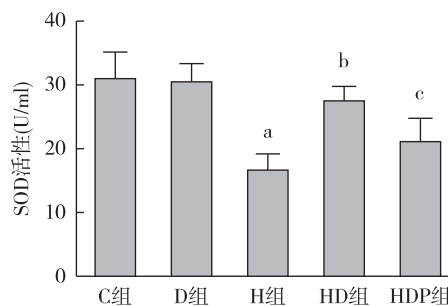
细胞生存率检测 用 MTT 法检测细胞相对活力。密度为 1×10^5 的 N2a 细胞接种于 96 孔板过夜后按实验分组给药, H_2O_2 刺激时间 4 h 后,检测各组 570 nm 吸光度值,细胞生存率 = 各组细胞吸光度值/对照组细胞吸光度值 $\times 100\%$,MTT 测定方法按产品说明书进行。

细胞形态学观察 密度为 1×10^5 的 N2a 细胞接种于 24 孔板过夜后按实验分组给药, H_2O_2 刺激时间 4 h 后,用相差倒置显微镜观察并照相。

统计分析 采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析。正态分布计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

与 C 组比较,H 组 N2a 细胞 SOD 活性明显降低($P < 0.05$);与 H 组比较,HD 组的细胞 SOD 活性明显升高($P < 0.05$);与 HD 组比较,HDP 组的细胞 SOD 活性明显降低($P < 0.05$)。C 组和 D 组细胞 SOD 活性差异无统计学意义(图 1)。

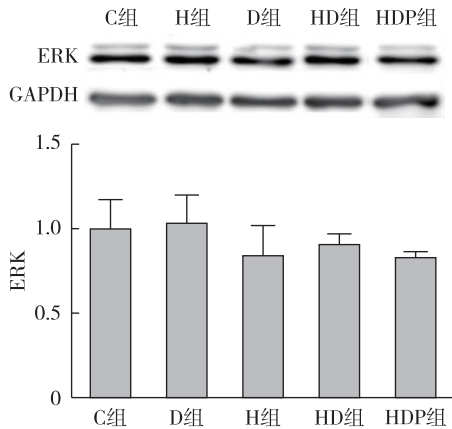


注:与 C 组比较,^a $P < 0.05$;与 H 组比较,^b $P < 0.05$;与 HD 组比较,^c $P < 0.05$

图 1 五组 N2a 细胞 SOD 活性的比较

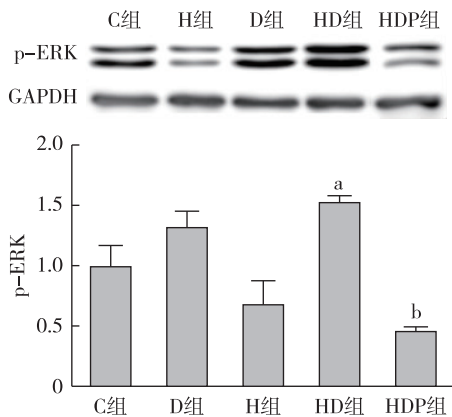
五组细胞之间总 ERK 蛋白含量差异无统计学

意义;与 C 组比较,H 组 N2a 细胞 p-ERK 蛋白含量减少,但差异无统计学意义;与 H 组比较,HD 组的细胞 p-ERK 蛋白含量明显增加($P<0.05$);与 HD 组比较,HDP 组的细胞 p-ERK 蛋白含量明显减少($P<0.05$)。C 组和 D 组 p-ERK 蛋白含量差异无统计学意义(图 2,3)。



注:与 H 组比较,^a $P<0.05$;与 HD 组比较,^b $P<0.05$

图 2 五组 N2a 细胞 ERK 蛋白含量的比较

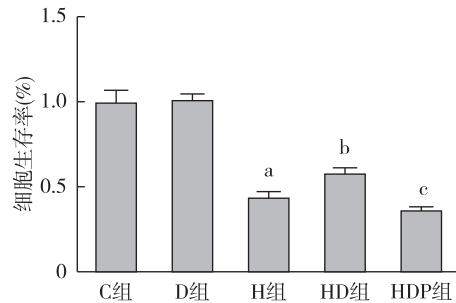


注:与 H 组比较,^a $P<0.05$;与 HD 组比较,^b $P<0.05$

图 3 五组 N2a 细胞 p-ERK 蛋白含量的比较

与 C 组比较,H 组 N2a 细胞生存率明显降低($P<0.05$);与 H 组比较,HD 组的细胞生存率明显升高($P<0.05$);与 HD 组比较,HDP 组的细胞生存率明显降低($P<0.05$);C 组和 D 组细胞生存率差异无统计学意义(图 4)。

细胞形态观察显示,C 组和 D 组细胞呈圆形或多边形,胞质饱满,细胞折光性好,突触伸展良好;与 C 组比较,H 组细胞胞体缩小变圆,突触回缩变细甚至断裂;与 H 组比较,HD 组细胞形态改变较少;与 HD 组比较,HDP 组的细胞形态恶化(图 5)。



注:与 C 组比较,^a $P<0.05$;与 H 组比较,^b $P<0.05$;与 HD 组比较,^c $P<0.05$

图 4 五组 N2a 细胞生存率的比较

讨 论

右美托咪定是一种高选择性 α_2 肾上腺素受体 (α_2 -AR) 激动药,在临床上常常作为麻醉辅助用药和 ICU 患者镇静治疗被广泛应用。近年来,较多研究报道了右美托咪定在保护神经系统功能和减轻氧化应激损伤中的作用。右美托咪定可以减轻海马 CA1 区的氧化应激损伤,改善创伤性脑损伤大鼠的空间学习和记忆能力,促进神经功能障碍的恢复^[4]。右美托咪定预处理能通过抑制 TLR4/NF- κ B、激活 TLR4/TRIF 信号通路降低炎症反应,从而减轻了脑缺血-再灌注损伤^[5]。本实验结果显示,在 H_2O_2 导致的细胞氧化应激损伤模型中,右美托咪定预处理减轻 N2a 细胞损伤,提高细胞生存率,改善细胞形态,从而减轻 H_2O_2 导致的 N2a 细胞氧化应激损伤,本实验结果与既往文献报道一致。

SOD 是一种抗氧化酶,能够有效清除氧自由基,减轻细胞氧化应激损伤。研究发现,右美托咪定可以抑制脂质过氧化产物 MDA 的产生,增强 SOD 活性^[6]。最近一项 Meta 分析研究显示,右美托咪定可以提高 SOD 活性,减轻炎症反应,减轻脑缺血性损伤^[7]。本实验中,右美托咪定增加 H_2O_2 刺激后 N2a 细胞的 SOD 活性,进一步证实 SOD 在右美托咪定减轻细胞氧化应激损伤过程中的重要介导作用。

本实验结果进一步提示 MAPK/ERK 信号的激活可能是右美托咪定预处理减轻 N2a 细胞氧化应激损伤的重要信号调控机制。MAPK 信号通路调节细胞增殖、运动,与细胞的生长、分裂、分化及死亡有着密切的关系。在蛛网膜下腔出血模型中,右美托咪定可以通过激活 ERK 信号通路减轻神经功能障碍、脑水肿及血脑屏障功能损伤^[1]。另一项

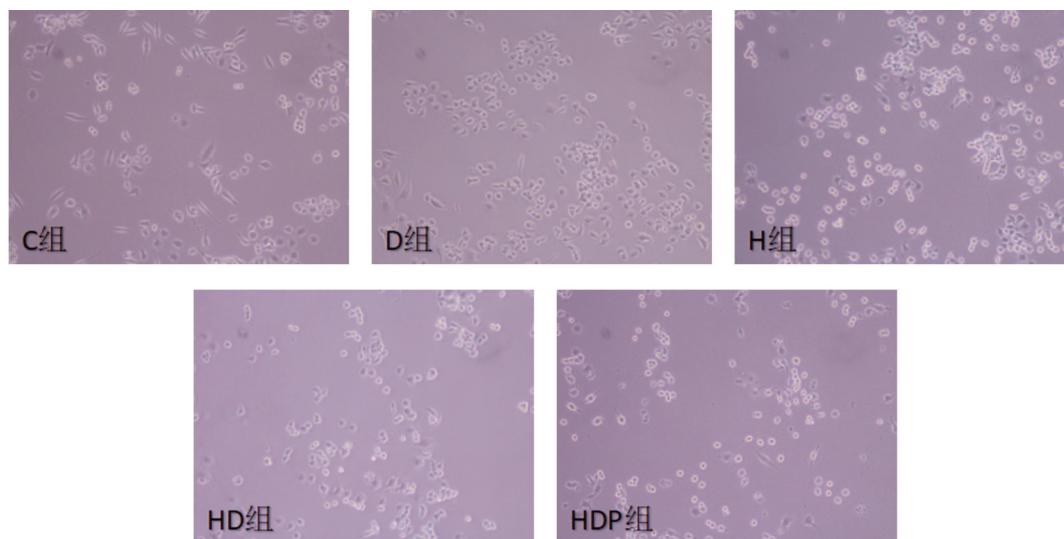


图 5 五组 N2a 细胞形态显微镜图 (×100)

研究发现,右美托咪定能减轻新生大鼠海马区神经元细胞的凋亡,这种保护作用是通过调控 JNK 和 p38,而非 ERK 信号通路产生^[8]。p38MAPK 信号通路还介导右美托咪定对布比卡因神经毒性的保护作用^[9]。本实验显示:ERK 抑制剂 PD98059 能够消除右美托咪定的保护作用,并阻断右美托咪定预处理提高 H_2O_2 刺激后 SOD 活力的作用,右美托咪定的神经保护机制与细胞内 MAPK/ERK 信号通路的激活有关。

综上所述,右美托咪定通过激活 MAPK/ERK 信号通路,减轻了 N2a 氧化应激损伤。右美托咪定减轻脑和脊髓氧化应激损伤的剂量、作用时间、给药方式有待进一步研究,以期为其临床应用提供更有效的理论和实践基础。

参 考 文 献

- [1] Wang Y, Han R, Zuo Z. Dexmedetomidine post-treatment induces neuroprotection via activation of extracellular signal-regulated kinase in rats with subarachnoid haemorrhage. *Br J Anaesth*, 2016, 116(3): 384-392.
- [2] Wang Q, Tan Y, Zhang N, et al. Dexmedetomidine inhibits activation of the MAPK pathway and protects PC12 and NG108-15 cells from lidocaine-induced cytotoxicity at its maximum safe dose. *Biomed Pharmacother*, 2017, 91: 162-166.
- [3] Tufek A, Kaya S, Tokgöz O, et al. The protective effect of dexmedetomidine on bupivacaine-induced sciatic nerve inflammation is mediated by mast cells. *Clin Invest Med*, 2013, 36(2): E95-E102.
- [4] 钱宝民, 高清丽, 房立峰, 等. 右美托咪定对创伤性脑损伤大鼠认知功能和海马 CA1 区氧化应激的影响. *临床麻醉学杂志*, 2015, 31(8): 801-805.
- [5] Wang SL, Duan L, Xia B, et al. Dexmedetomidine preconditioning plays a neuroprotective role and suppresses TLR4/NF-kappaB pathways model of cerebral ischemia reperfusion. *Biomed Pharmacother*, 2017, 93: 1337-1342.
- [6] Cosar M, Eser O, Fidan H, et al. The neuroprotective effect of dexmedetomidine in the hippocampus of rabbits after subarachnoid hemorrhage. *Surg Neurol*, 2009, 71(1): 54-59.
- [7] Jiang L, Hu M, Lu Y, et al. The protective effects of dexmedetomidine on ischemic brain injury: a meta-analysis. *J Clin Anesth*, 2017, 40: 25-32.
- [8] Liao Z, Cao D, Han X, et al. Both JNK and P38 MAPK pathways participate in the protection by dexmedetomidine against isoflurane-induced neuroapoptosis in the hippocampus of neonatal rats. *Brain Res Bull*, 2014, 107: 69-78.
- [9] 周斌, 肖凡, 黄丹, 等. p38MAPK 信号通路在右美托咪定抗布比卡因神经毒性损伤中的作用. *临床麻醉学杂志*, 2017, 33(3): 281-285.

(收稿日期:2018-01-05)